

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-69755

(P2011-69755A)

(43) 公開日 平成23年4月7日(2011.4.7)

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01) GO 1 N 33/543 5 O 1 L
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 N

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2009-221897 (P2009-221897)
 (22) 出願日 平成21年9月28日 (2009.9.28)

(71) 出願人 390029791
 アロカ株式会社
 東京都三鷹市牟礼6丁目2番1号
 (74) 代理人 100075258
 弁理士 吉田 研二
 (74) 代理人 100096976
 弁理士 石田 純
 (72) 発明者 松葉 恭一
 東京都三鷹市牟礼6丁目2番1号 アロ
 カ株式会社内
 (72) 発明者 斉藤 博樹
 東京都三鷹市牟礼6丁目2番1号 アロ
 カ株式会社内

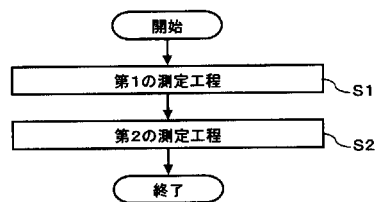
(54) 【発明の名称】 免疫測定方法および装置

(57) 【要約】

【課題】免疫測定において試料中の測定対象の抗原または抗体の含量が当初の測定範囲を超える場合に、有利に測定範囲を拡大して再測定を行うことを可能にする。

【解決手段】免疫測定方法は、所定量の抗体または抗原が固定化された反応容器に、測定対象の抗原または抗体を含む試料を含む第1の量の溶液を注入し、抗原抗体複合体を形成させ、当該抗原抗体複合体の量を測定することによって上記試料に含まれる抗原または抗体の量を測定する第1の測定工程(S1)と、第1の測定工程の測定の結果、上記試料に含まれる抗原または抗体の量が第1の測定工程の測定範囲を超える場合、上記所定量の抗体または抗原が固定化された別の反応容器に、上記試料を含む上記第1の量より多い第2の量の溶液を注入し、抗原抗体複合体を形成させ、当該抗原抗体複合体の量を測定することによって上記試料に含まれる抗原または抗体の量を測定する第2の測定工程(S2)とを含む。

【選択図】 図5



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

所定量の抗体または抗原が固定化された反応容器に、測定対象の抗原または抗体を含む試料を含む第 1 の量の溶液を注入し、抗原抗体複合体を形成させ、当該抗原抗体複合体の量を測定することによって前記試料に含まれる抗原または抗体の量を測定する第 1 の測定工程と、

前記第 1 の測定工程の測定の結果、前記試料に含まれる抗原または抗体の量が前記第 1 の測定工程の測定範囲を超える場合、前記所定量の抗体または抗原が固定化された別の反応容器に、前記試料を含む前記第 1 の量より多い第 2 の量の溶液を注入し、抗原抗体複合体を形成させ、当該抗原抗体複合体の量を測定することによって前記試料に含まれる抗原

10

を含むことを特徴とする免疫測定方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の免疫測定方法であって、

前記第 2 の測定工程の溶液は、前記第 1 の測定工程の溶液に含まれる試料と同量の試料を含むことを特徴とする免疫測定方法。

【請求項 3】

所定量の抗体または抗原が固定化された反応容器に、測定対象の抗原または抗体を含む試料を含む第 1 の量の溶液を注入し、抗原抗体複合体を形成させ、当該抗原抗体複合体の量を測定することによって前記試料に含まれる抗原または抗体の量を測定する第 1 の測定

20

工程を実行する手段と、
前記第 1 の測定工程の測定の結果、前記試料に含まれる抗原または抗体の量が前記第 1 の測定工程の測定範囲を超える場合、前記所定量の抗体または抗原が固定化された別の反応容器に、前記試料を含む前記第 1 の量より多い第 2 の量の溶液を注入し、抗原抗体複合体を形成させ、当該抗原抗体複合体の量を測定することによって前記試料に含まれる抗原

または抗体の量を測定する第 2 の測定工程を実行する手段と、

を含むことを特徴とする免疫測定装置。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

30

本発明は、抗原抗体反応を用いる免疫測定方法および装置に関する。

【背景技術】**【0002】**

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) など、抗原抗体反応を用いる免疫測定法 (イムノアッセイ) が知られている。

【0003】

例えば、サンドイッチ ELISA では、抗体 (または抗原) が固定化された反応容器に、測定対象となる抗原 (または抗体) を含む検体を分注し、検体中の抗原等を固定化された抗体等と反応させ、抗原抗体複合体を形成させる。その後、当該抗原抗体複合体と標識抗体または標識抗原を反応させ、サンドイッチ複合体を形成させる。そして、サンドイッチ複合体の量を測定することにより、試料に含まれる抗原等の量を測定する。

40

【0004】

特許文献 1 には、生化学検査におけるアルカリフォスファターゼの測定法において、1 回目の測定結果が定量上限を超えたサンプルについて、サンプルの希釈率を自動的に可変 (試薬量は 1 回目の測定条件と同じにしてサンプル量を少なくして希釈率を大きくする) して再検査を行うことが記載されている。

【0005】

特許文献 2 には、試料中の目的成分の濃度または活性値を測定する自動分析装置において、試料が濃度または活性値の算出が可能な濃度範囲の限界を外れている場合に、試料濃度を変えた再検査を指示することが記載されている。

50

【 0 0 0 6 】

特許文献 3 には、排水の BOD（生物学酸素要求量）と紫外線吸光度との関係の直線性を利用して BOD を測定する BOD 測定装置において、原排水と希釈水を混合して所定の希釈倍率の希釈原排水を得て、当該希釈原排水の紫外線吸光度を測定し、吸光度が設定値以上である場合に、希釈倍率を上げて再度吸光度を測定することが記載されている。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 7 】

【 特許文献 1 】 特開昭 63 - 129998 号公報

【 特許文献 2 】 特開平 6 - 34638 号公報

【 特許文献 3 】 特開平 7 - 191015 号公報

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 8 】

ところで、免疫測定において、試料中の測定対象の抗原または抗体の含量が多くて当初の測定範囲を超える場合、試料を別容器で希釈し、希釈された試料を当初の測定と同量だけ反応容器に入れて再測定することが考えられる。

【 0 0 0 9 】

本発明は、免疫測定において、試料中の測定対象の抗原または抗体の含量が当初の測定範囲を超える場合に、試料を希釈するだけの場合と比べて有利に測定範囲を拡大して再測定を行うことが可能な免疫測定方法および装置を提供する。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 0 】

本発明に係る免疫測定方法は、所定量の抗体または抗原が固定化された反応容器に、測定対象の抗原または抗体を含む試料を含む第 1 の量の溶液を注入し、抗原抗体複合体を形成させ、当該抗原抗体複合体の量を測定することによって前記試料に含まれる抗原または抗体の量を測定する第 1 の測定工程と、前記第 1 の測定工程の測定の結果、前記試料に含まれる抗原または抗体の量が前記第 1 の測定工程の測定範囲を超える場合、前記所定量の抗体または抗原が固定化された別の反応容器に、前記試料を含む前記第 1 の量より多い第 2 の量の溶液を注入し、抗原抗体複合体を形成させ、当該抗原抗体複合体の量を測定することによって前記試料に含まれる抗原または抗体の量を測定する第 2 の測定工程と、を含むことを特徴とする。

【 0 0 1 1 】

本発明の一態様では、前記第 2 の測定工程の溶液は、前記第 1 の測定工程の溶液に含まれる試料と同量の試料を含む。

【 0 0 1 2 】

本発明に係る免疫測定装置は、所定量の抗体または抗原が固定化された反応容器に、測定対象の抗原または抗体を含む試料を含む第 1 の量の溶液を注入し、抗原抗体複合体を形成させ、当該抗原抗体複合体の量を測定することによって前記試料に含まれる抗原または抗体の量を測定する第 1 の測定工程を実行する手段と、前記第 1 の測定工程の測定の結果、前記試料に含まれる抗原または抗体の量が前記第 1 の測定工程の測定範囲を超える場合、前記所定量の抗体または抗原が固定化された別の反応容器に、前記試料を含む前記第 1 の量より多い第 2 の量の溶液を注入し、抗原抗体複合体を形成させ、当該抗原抗体複合体の量を測定することによって前記試料に含まれる抗原または抗体の量を測定する第 2 の測定工程を実行する手段と、を含むことを特徴とする。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 3 】

本発明によれば、免疫測定において、試料中の測定対象の抗原または抗体の含量が当初の測定範囲を超える場合に、試料を希釈するだけの場合と比べて有利に測定範囲を拡大して再測定を行うことが可能となる。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】反応溶液量を10 μ Lとしたときの抗原量と抗原抗体複合体量との関係を示すグラフである。

【図2】反応溶液量を300 μ Lとしたときの抗原量と抗原抗体複合体量との関係を示すグラフである。

【図3】反応溶液量を10 μ Lとしたときに対応する、抗原量とサンドイッチ複合体量との関係を示すグラフである。

【図4】反応溶液量を300 μ Lとしたときに対応する、抗原量とサンドイッチ複合体量との関係を示すグラフである。

【図5】実施の形態に係る免疫測定方法の手順を示すフローチャートである。

【図6】実施の形態に係る免疫測定方法の具体的な手順の一例を示すフローチャートである。

【図7】実施の形態に係る免疫測定方法に用いられる反応容器の構造の一例を示す斜視図である。

【図8】本実施の形態に係る免疫測定方法に用いられる反応容器の構造の一例を示す断面図である。

【図9】本実施の形態に係る免疫測定方法に用いられる反応容器の構造の一例を示す上面図である。

【図10】本実施の形態に係る免疫測定方法に用いられる反応容器の構造の一例を示す側面図である。

【図11】反応容器の構造の別の一例を示す斜視図である。

【図12】反応容器の構造の別の一例を示す断面図である。

【図13】反応容器の構造のさらに別の一例を示す斜視図である。

【図14】反応容器の構造のさらに別の一例を示す断面図である。

【図15】実施の形態に係る免疫測定装置の構成の一例を示すブロック図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

以下、本発明の実施の形態を図面に従って説明する。

【0016】

抗原抗体反応において、抗原と抗体は水素結合、クーロン力、ファンデルワールス力で結合しており、その結合は可逆的である。また、その反応には、質量作用の法則が成り立ち、十分な反応時間をとったとしても、抗原、抗体の濃度、抗体の親和力によって、抗原抗体複合体、遊離の抗原、抗体の濃度が決まる。具体的には、下記式(1)が成立する。

$$K_a = [Ag - Ab] / [Ag][Ab] \\ = K_{on} / K_{off} \quad \dots (1)$$

【0017】

上記式(1)において、[Ag]、[Ab]、[Ag - Ab]はそれぞれ抗原、抗体、抗原抗体複合体のモル濃度(mol/L)であり、 K_a は結合定数である。また、 K_{on} は結合速度定数であり、 K_{off} は解離速度定数である。

【0018】

反応前の抗原のモル濃度をa、反応前の抗体のモル濃度をb、反応後に形成された抗原抗体複合体のモル濃度をxとすると、下記式(2)が成立する。

$$K_a = x / (a - x)(b - x) \quad \dots (2)$$

【0019】

上記式(2)を変形すると、下記式(3)が得られる。

10

20

30

40

【数 1】

$$x^2 - \left(a + b + \frac{1}{ka} \right) x + ab = 0 \quad \dots (3)$$

【0020】

上記式(3)をさらに変形すると、下記式(4)が得られる。

【数 2】

$$x = \frac{1}{2} \left\{ a + b + \frac{1}{ka} - \sqrt{\left(a + b + \frac{1}{ka} \right)^2 - 4ab} \right\} \quad \dots (4)$$

10

【0021】

上記式(4)を用いて、反応前の抗原および抗体の濃度から、形成される抗原抗体複合体の濃度を計算することができる。

【0022】

ここで、底面に抗体(1次抗体)が固定された反応容器に、抗原を含む反応溶液を入れて反応させた場合を例にとって、以下の条件で実際に計算してみると、図1, 2に示される計算結果が得られる。なお、ここでは、1次抗体はモノクローナル抗体であるものとする。

20

(条件)

抗原の分子量: 24000

抗体固定量: 1000 ~ 1.0 ng / well
 $= 6.7 \times 10^{-12} \sim 6.7 \times 10^{-15} \text{ mol / well}$

抗原量: 100 ~ 1×10^{-4} ng
 $= 4 \times 10^{-12} \sim 4 \times 10^{-18} \text{ mol}$

結合定数: 1×10^9 (一般的なマウスモノクローナル抗体の値)反応溶液量: 10 μ L、300 μ L

反応容器: 内径 8 mm、底面のみ抗体を固定、容器深さ 6 mm 以上

30

【0023】

図1, 2は、抗原量(または濃度)と抗原抗体複合体量(または濃度)との関係を示すグラフである。図1には、反応溶液量を10 μ Lとしたときの計算結果が示されており、図2には、反応溶液量を300 μ Lとしたときの計算結果が示されている。

【0024】

図1, 2において、丸印、四角印、三角印、バツ印は、それぞれ、抗体固定量を1000, 100, 10, 1 ng / wellとしたときの結果を示す。したがって、丸印、四角印、三角印、バツ印は、図1においては抗体濃度 6.7×10^{-7} , 6.7×10^{-8} , 6.7×10^{-9} , $6.7 \times 10^{-10} \text{ mol / L}$ に対応し、図2においては抗体濃度 2.2×10^{-8} , 2.2×10^{-9} , 2.2×10^{-10} , $2.2 \times 10^{-11} \text{ mol / L}$ に対応する。

40

【0025】

図1, 2のバツ印を見てみると、図1では抗原量が約 $3 \times 10^{-14} \text{ mol}$ でプラトーに達しているのに対し、図2では抗原量が約 $3 \times 10^{-13} \text{ mol}$ でプラトーに達している。また、三角印を見てみると、図1では抗原量が約 $1 \times 10^{-13} \text{ mol}$ でプラトーに達しているのに対し、図2では抗原量が約 $3 \times 10^{-13} \text{ mol}$ でプラトーに達している。また、四角印を見てみると、図1では抗原量が約 $1 \times 10^{-12} \text{ mol}$ でプラトーに達しているのに対し、図2では抗原量が約 $1 \times 10^{-12} \text{ mol}$ でプラトーに達している。

【0026】

50

このように、図1と図2とを比較してみると分かるように、抗体固定量が少ない場合、反応溶液量を10 μ Lから300 μ Lに増やすと、プラトーに達する抗原量は3~10倍になり、抗原量が多い領域での直線性が増加する。すなわち、抗原量の変化に応じて抗原抗体複合体量が十分な変化を示す領域が広がる。

【0027】

次に、上記の計算結果を利用して、上記反応容器に一定濃度(6.7 $\times 10^{-9}$ mol/L)の2次抗体を入れ、上記抗原抗体複合体と2次抗体を反応させた場合に得られるサンドイッチ複合体(1次抗体-抗原-2次抗体)の量(および濃度)を計算すると、図3, 4に示される計算結果が得られる。なお、ここでは、2次抗体はモノクローナル抗体であるものとする。

10

【0028】

図3, 4は、抗原量(または濃度)とサンドイッチ複合体量(または濃度)との関係を示すグラフである。図3は、図1に続いて得られるものであり、反応溶液量を10 μ Lとしたときに対応する。図4は、図2に続いて得られるものであり、反応溶液量を300 μ Lとしたときに対応する。

【0029】

図3, 4において、丸印、四角印、三角印、バツ印は、図1, 2と同様、それぞれ、抗体固定量を1000, 100, 10, 1ng/wellとしたときの結果を示す。

【0030】

図3, 4のバツ印を見てみると、図3では抗原量が約3 $\times 10^{-14}$ molでプラトーに達しているのに対し、図4では抗原量が約3 $\times 10^{-13}$ molでプラトーに達している。また、丸印を見てみると、図3では抗原量が約1 $\times 10^{-13}$ molでプラトーに達しているのに対し、図4では抗原量が約3 $\times 10^{-12}$ molでプラトーに達している。

20

【0031】

このように、図3と図4とを比較してみると分かるように、反応溶液量を10 μ Lから300 μ Lに増やすと、プラトーに達する抗原量は10~30倍になり、抗原量が多い領域での直線性が増加する。すなわち、抗原量の変化に応じてサンドイッチ複合体量が十分な変化を示す領域が広がる。

【0032】

サンドイッチELISAでは、2次抗体には標識がなされており、その標識からのシグナル量を測定することにより、抗原量(または濃度)を測定する。ここで、シグナル量はサンドイッチ複合体量に比例するため、反応溶液量を増加させると、抗原量を定量的に測定できる範囲が拡大すると言える。

30

【0033】

このような傾向は、親和力の弱い抗体(すなわち結合定数Kaの小さい抗体)を用いると、より顕著となる。これは、結合力が弱いため、より高い抗原量(または濃度)でないとプラトーにならないためである。

【0034】

なお、上記では、抗体が固定化された反応容器に、測定対象となる抗原を含む溶液を入れる場合を例にとって説明したが、抗原が固定化された反応容器に、測定対象となる抗体を含む溶液を入れる場合も同様である。すなわち、上記の説明において、抗体と抗原を逆にしても同様の結果が得られる。

40

【0035】

以上の結果より、本実施の形態では、測定対象の抗原または抗体の量を測定する際、当初の測定(通常測定)では、検出感度が良く、反応時間短縮が図れる反応溶液量が比較的少ない条件で測定を行う。そして、試料(検体)中の測定対象物の含量が多くて測定不能な場合は、反応溶液量を増加させ、反応溶液量が当初よりも多い条件で再測定を行う。

【0036】

図5は、本実施の形態に係る免疫測定方法の手順を示すフローチャートである。

【0037】

50

図5に示されるように、本実施の形態に係る免疫測定方法は、第1の測定工程(S1)および第2の測定工程(S2)を含む。

【0038】

第1の測定工程では、所定量の抗体または抗原が固定化された反応容器に、測定対象の抗原または抗体を含む試料を含む第1の量の溶液を注入し、抗原抗体複合体を形成させ、当該抗原抗体複合体の量を測定することによって上記試料に含まれる抗原または抗体の量を測定する(S1)。

【0039】

上記第1の測定工程の測定の結果、試料に含まれる抗原または抗体の量が第1の測定工程の測定範囲を超える場合、再測定のための第2の測定工程を行う。

10

【0040】

第2の測定工程では、上記所定量の抗体または抗原が固定化された別の反応容器に、試料を含む第1の量より多い第2の量の溶液を注入し、抗原抗体複合体を形成させ、当該抗原抗体複合体の量を測定することによって試料に含まれる抗原または抗体の量を測定する(S2)。すなわち、溶液量を増やして再測定を行う。上記「別の反応容器」は、第1の測定工程で用いられた反応容器とは別の反応容器を意味する。具体的な一態様では、第2の測定工程で用いられる別の反応容器は、第1の測定工程で用いられる反応容器と同様の容器である。すなわち、第1の測定工程と第2の測定工程とで、反応容器の寸法、形状、抗体等の固定量など、反応容器の仕様は同じである。

【0041】

一つの態様では、第2の測定工程の溶液は、第1の測定工程の溶液に含まれる試料と同量の試料を含む。したがって、例えば、第2の測定工程では、試料の量を第1の測定工程と実質的に同じとしつつ、希釈液を第1の測定工程より増やすことにより溶液量を増やす。より具体的には、第2の測定工程では、第1の測定工程と実質的に同じ量の試料を反応容器に入れるとともに、第1の測定工程より多量の希釈液を反応容器に入れる。

20

【0042】

なお、上記測定される抗原または抗体の量は、具体的には、試料中の抗原または抗体の濃度であってもよいし、反応容器に入れられた試料中の抗原または抗体の絶対量(例えばモル数)であってもよい。

【0043】

図6は、本実施の形態に係る免疫測定方法の具体的な手順の一例を示すフローチャートである。以下、図6を参照して、サンドイッチELISAを例にとって具体的な手順の一例を説明する。

30

【0044】

まず、1次抗体が底面に固定化された反応容器に、測定対象となる抗原を含む検体(例えば血清や尿)を含む第1の量の溶液を分注し(S11)、抗原抗体反応(1次反応)させる(S12)。これにより、1次抗体に抗原が結合して、抗原抗体複合体が形成される。ここで、第1の量は例えば10 μ Lであり、ステップS11では、例えば、検体を1 μ L、希釈液(バッファ液)を9 μ L分注する。

【0045】

次に、1次洗浄(B/F分離)を行って、未反応の抗原などを除去する(S13)。

40

【0046】

次に、酵素標識抗体である2次抗体を含む溶液を反応容器に分注し(S14)、抗原抗体反応(2次反応)させる(S15)。これにより、抗原抗体複合体に2次抗体が結合して、サンドイッチ複合体(1次抗体-測定対象の抗原-2次抗体)が形成される。

【0047】

次に、2次洗浄(B/F分離)を行って、未反応の二次抗体などを除去する(S16)。

【0048】

次に、反応容器に基質を分注し(S17)、発光、蛍光、吸光などのシグナルを測定す

50

る (S 1 8) 。

【 0 0 4 9 】

次に、検体中の抗原の量が測定範囲を超えているか否かを判断する (S 1 9) 。 具体的には、ステップ S 1 8 で測定されたシグナルが所定の上限値を超えているか否かを判断する。

【 0 0 5 0 】

シグナルが上限値を超えていないと判断した場合、すなわち検体中の抗原の量が測定範囲を超えていないと判断した場合 (S 1 9 : N O) 、再測定は不要であるとして、ステップ S 1 8 で測定されたシグナル (すなわち 1 回目に測定されたシグナル) に基づき、検体中の抗原の量 (または濃度) を定量する (S 2 0) 。 具体的には、検体中の抗原の量とシグナルとの対応関係を示す予め作成された第 1 の検量線を用いて、上記シグナルに基づいて検体中の抗原の量を求める。ここで、第 1 の検量線は、第 1 の量の溶液を分注した場合に対応するものである。ステップ S 1 9 における判断方法としては、例えば定量値 (検体中の抗原の量) の相対標準偏差 (標準偏差 / 平均値) を求め、所定の範囲 (例えば 1 0 % 以内) に収まるか否かで判断するようにしてもよい。

10

【 0 0 5 1 】

一方、シグナルが上限値を超えていると判断した場合、すなわち検体中の抗原の量が測定範囲を超えていると判断した場合 (S 1 9 : Y E S) 、再測定が必要であるとして、溶液量を増やして 2 回目の測定を行う。

【 0 0 5 2 】

具体的には、1回目の測定と同仕様の別の反応容器に、測定対象となる抗原を含む検体を含む第 2 の量の溶液を分注し (S 2 1) 、抗原抗体反応 (1 次反応) させる (S 2 2) 。これにより、抗原抗体複合体が形成される。ここで、第 2 の量は、1回目の測定における第 1 の量よりも多く、例えば 1 0 0 μ L である。ステップ S 2 1 では、ステップ S 1 1 と同量の検体 (例えば 1 μ L) を分注し、ステップ S 1 1 よりも多量のバッファ液 (例えば 2 9 9 μ L) を分注する。

20

【 0 0 5 3 】

次に、1次洗浄 (B / F 分離) を行って、未反応の抗原などを除去する (S 2 3) 。

【 0 0 5 4 】

次に、酵素標識抗体である 2 次抗体を含む溶液を反応容器に分注し (S 2 4) 、抗原抗体反応 (2 次反応) させる (S 2 5) 。これにより、サンドイッチ複合体が形成される。具体的には、ステップ S 2 5 では、上記ステップ S 1 5 と同じ 2 次抗体濃度の溶液を分注する。分注される溶液の量は、例えばステップ S 1 5 と同じである。

30

【 0 0 5 5 】

次に、2次洗浄 (B / F 分離) を行って、未反応の二次抗体などを除去する (S 2 6) 。

【 0 0 5 6 】

次に、反応容器に基質を分注し (S 2 7) 、発光、蛍光、吸光などのシグナルを測定する (S 2 8) 。

【 0 0 5 7 】

そして、ステップ S 2 8 で測定されたシグナル (すなわち 2 回目に測定されたシグナル) に基づき、検体中の抗原の量 (または濃度) を定量する (S 2 9) 。 具体的には、検体中の抗原の量とシグナルとの対応関係を示す予め作成された第 2 の検量線を用いて、上記シグナルに基づいて検体中の抗原の量を求める。ここで、第 2 の検量線は、第 2 の量の溶液を分注した場合に対応するものである。第 2 の検量線は、第 1 の検量線とは異なる形状を有し、感度を有する領域 (すなわち抗原の量の変化に応じてシグナルが十分な変化を示す領域) が第 1 の検量線よりも広い。例えば、第 1 の検量線は図 3 に対応し、第 2 の検量線は図 4 に対応する。

40

【 0 0 5 8 】

なお、上記の説明では、再測定を 1 回行う場合を例示したが、再測定を 2 回以上行うよ

50

うにしてもよい。例えば、2回目の測定の結果、試料に含まれる抗原または抗体の量が2回目の測定の測定範囲を超える場合、さらに溶液量を増やして3回目の測定を行ってもよい。同様に、4回目以降の測定を行ってもよい。

【0059】

上記本実施の形態に係る免疫測定方法において、反応容器は、抗体または抗原が固定された底面の表面に反応溶液を薄く広げることができ、かつ再測定時には液量を増加させることができるように構成されていることが好ましい。

【0060】

ここで、均一な抗原抗体反応を得る観点より、底面の表面全体に反応溶液が行き渡ることが望ましく、メニスカスが形成されることは望ましくない。

10

【0061】

そこで、メニスカスの形成を防止する等の観点より、一つの態様では、反応容器は、抗体または抗原が表面に固相化された底面部と、当該底面部の周囲に設けられ、第1および第2の測定工程に対応する少なくとも2段の液体収容部を形成する側壁部とを有し、上記液体収容部は、当該液体収容部に対応する測定工程の予め定められた量の溶液が注入された場合に、当該液体収容部の上端開口の周縁部が上記溶液の液面と同レベルの水平面を形成するように形成される。

【0062】

図7、8、9、10は、それぞれ本実施の形態に係る免疫測定方法に用いられる反応容器の構造の一例を示す斜視図、断面図、上面図、側面図である。

20

【0063】

図7～10に示されるように、反応容器1は、底面部10および側壁部20を有する。

【0064】

底面部10の表面には、抗体または抗原が固定化される。例えば、サンドイッチELISAにおいて、底面部10の表面には、一次抗体が固定化される。

【0065】

側壁部20は、底面部10の周囲に設けられ、第1および第2の測定工程を含む免疫測定工程に対応する2段以上の液体収容部を形成する。図7～10の例では、側壁部20は、複数段(具体的には4段)の液体収容部31, 32, 33, 34を形成する。すなわち、反応容器1は、側壁部20が複数の段を持つ構造となっている。液体収容部31, 32, 33, 34のそれぞれの上端開口の周囲には、周縁部31a, 32a, 33a, 34aが形成されている。

30

【0066】

液体収容部は、当該液体収容部に対応する工程の予め定められた量の液体が注入された場合に、当該液体収容部の上端開口の周縁部が当該液体の液面と同レベルの水平面を形成するように形成される。

【0067】

具体的には、液体収容部の容量は、当該液体収容部に対応する工程の予め定められた液量と等しくなっており、当該液体収容部の上端開口の周縁部は水平面状に形成されている。ここで、液体収容部の容量は、上記予め定められた液量と厳密に等しくなくても、略等しければよく、例えばやや少な目になっていてもよい。

40

【0068】

例えば、1段目の液体収容部31は1回目の測定工程に対応し、1段目の液体収容部31の容量は第1の量と等しい。また、2段目の液体収容部32は2回目の測定工程に対応し、2段目の液体収容部32の容量は第2の量と等しい。

【0069】

ところで、図7～10に示される構造では、反応容器1は直角の隅部を含み、洗浄の際に、この隅部に洗浄液等の廃液が残る可能性がある。そこで、好適な一態様では、側壁部20は、底面部10および周縁部のうち少なくとも1つの外周側の側面が外側に向かって上昇する傾斜面となるように形成される。傾斜面は、望ましくは曲面であり、より望まし

50

くは緩やかに上昇する曲面である。例えば、図 1 1 , 1 2 に示されるように、反応容器 1 は、多段のお椀状の構造を有する。

【 0 0 7 0 】

なお、反応容器 1 の段構造は、図 7 ~ 1 0 のような階段状に限られず、例えば図 1 3 , 1 4 に示されるような、側面に窪みを持つ構造など、階段状以外の構造とされてもよい。図 1 3 , 1 4 では、反応容器の側面には、第 1 の量および第 2 の量のそれぞれに対応する高さ、窪みが設けられている。

【 0 0 7 1 】

液面の高さが異なり、測光上不都合が生じる場合には、反応容器は透明とされ、反応容器の下面側から測光される。

【 0 0 7 2 】

上記本実施の形態に係る免疫測定方法は、例えば、自動分析装置などの免疫測定装置により実行される。

【 0 0 7 3 】

図 1 5 は、本実施の形態に係る免疫測定装置の構成の一例を示すブロック図である。

【 0 0 7 4 】

図 1 5 において、免疫測定装置 5 0 は、分注機構 5 1、洗浄機構 5 2、検出機構 5 3、および制御装置 5 4 を有する。

【 0 0 7 5 】

分注機構 5 1 は、試料、希釈液、二次抗体、基質などの液体を反応容器に分注する機構である。分注機構 5 1 は、例えば、分注ノズルと、分注ノズルにて液体を吸引、吐出する吸引吐出機構と、分注ノズルを移動させる移動機構とを含む。

【 0 0 7 6 】

洗浄機構 5 2 は、1 次洗浄や 2 次洗浄など、反応容器を洗浄する機構である。洗浄機構 5 2 は、例えば、洗浄ノズルと、洗浄ノズルにて洗浄液を吸引、吐出する吸引吐出機構と、洗浄ノズルを移動させる移動機構とを含む。

【 0 0 7 7 】

検出機構 5 3 は、反応容器内の液体の、発光、蛍光、吸光などのシグナルを検出する機構である。検出機構 5 3 は、例えば、反応容器内の液体の発光量を検出する光電子増倍管などの光検出器を含む。

【 0 0 7 8 】

制御装置 5 4 は、免疫測定装置 5 0 の動作を制御する。具体的には、制御装置 5 4 は、分注機構 5 1、洗浄機構 5 2、および検出機構 5 3 を用いて、第 1 の測定工程および第 2 の測定工程を実行する制御を行う。一つの態様では、制御装置 5 4 は、ハードウェア資源とソフトウェアとの協働により実現され、例えばコンピュータにより実現される。具体的には、制御装置 5 4 は、プログラムが記録された記録媒体と、メインメモリと、CPU (Central Processing Unit) とを含み、制御装置 5 4 の機能は、記録媒体に記録されたプログラムがメインメモリに読み出されて CPU により実行されることによって実現される。上記プログラムは、CD - ROM 等のコンピュータ読み取り可能な記録媒体に記録されて提供されることも可能であるし、データ信号として通信により提供されることも可能である。ただし、制御装置 5 4 は、ハードウェアのみにより実現されてもよい。

【 0 0 7 9 】

以上説明した本実施の形態によれば、以下の効果が得られる。

【 0 0 8 0 】

(1) 本実施の形態では、所定量の抗体または抗原が固定化された反応容器に、測定対象の抗原または抗体を含む試料を含む第 1 の量の溶液を注入し、抗原抗体複合体を形成させ、当該抗原抗体複合体の量を測定することによって上記試料に含まれる抗原または抗体の量を測定する第 1 の測定工程を行う。そして、第 1 の測定工程の測定の結果、上記試料に含まれる抗原または抗体の量が第 1 の測定工程の測定範囲を超える場合、上記所定量の抗体または抗原が固定化された別の反応容器に、上記試料を含む上記第 1 の量より多い第

10

20

30

40

50

2の量の溶液を注入し、抗原抗体複合体を形成させ、当該抗原抗体複合体の量を測定することによって上記試料に含まれる抗原または抗体の量を測定する第2の測定工程を行う。すなわち、免疫測定において、試料中の測定対象物の含量が多くて測定範囲を超える場合に、溶液量を増やして再測定を行う。これにより、試料中の測定対象物の含量が当初の測定範囲を超える際に、試料を希釈するだけの場合と比べて有利に測定範囲を拡大して再測定を行うことが可能となる。

【0081】

(2) 試料および希釈液を直接反応容器に注入して液量を増やして再測定を行うことができ、他容器で試料を希釈したものを反応容器に移して再測定を行う場合と比べて、工程を簡易化することができる。

10

【0082】

(3) 一つの態様では、第2の測定工程の溶液は、第1の測定工程の溶液に含まれる試料と同量の試料を含む。この態様によれば、第1の測定工程と第2の測定工程とで同量の試料を注入すればよく、試料の注入が容易となる。

【0083】

(4) 一つの態様では、第2の測定工程で用いられる反応容器は、第1の測定工程で用いられる反応容器と同じ仕様のものである。この態様によれば、再測定用の別仕様の反応容器を用意する必要がなく、コストを抑えることができる。

【0084】

(5) 一つの態様では、反応容器は、抗体または抗原が表面に固定化された底面部と、当該底面部の周囲に設けられ、第1および第2の測定工程に対応する少なくとも2段の液体収容部を形成する側壁部とを有する。そして、上記液体収容部は、当該液体収容部に対応する工程の予め定められた量の液体が注入された場合に、当該液体収容部の上端開口の周縁部が液体の液面と同レベルの水平面を形成するように形成される。このため、第1および第2の測定工程において、予め定められた第1および第2の量の溶液を注入した場合に、液面が略平坦となり、実質的にメニスカスが形成されない。これにより、底面部の表面全体に均一に液体が行き渡り、均一な抗原抗体反応が得られる。

20

【0085】

なお、本発明は、上記実施の形態に限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲内で種々変更することができる。

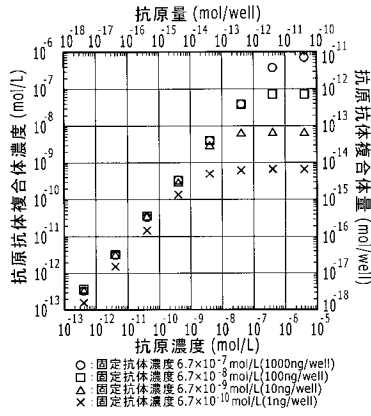
30

【符号の説明】

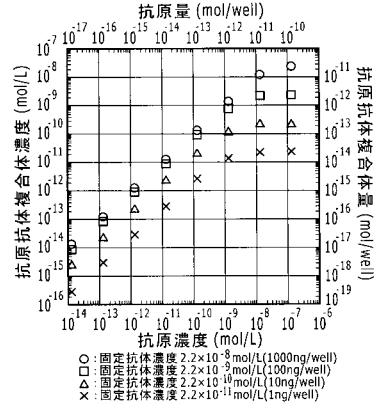
【0086】

1 反応容器、10 底面部、20 側壁部、31～34 側壁部、31a～34a 周縁部、50 免疫測定装置、51 分注機構、52 洗浄機構、53 検出機構、54 制御装置。

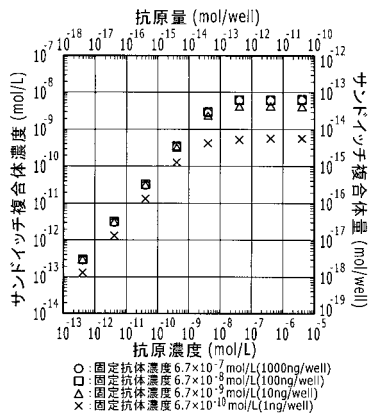
【 図 1 】



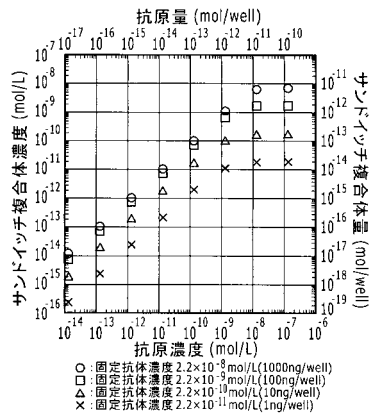
【 図 2 】



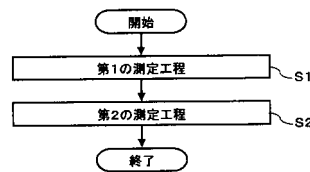
【 図 3 】



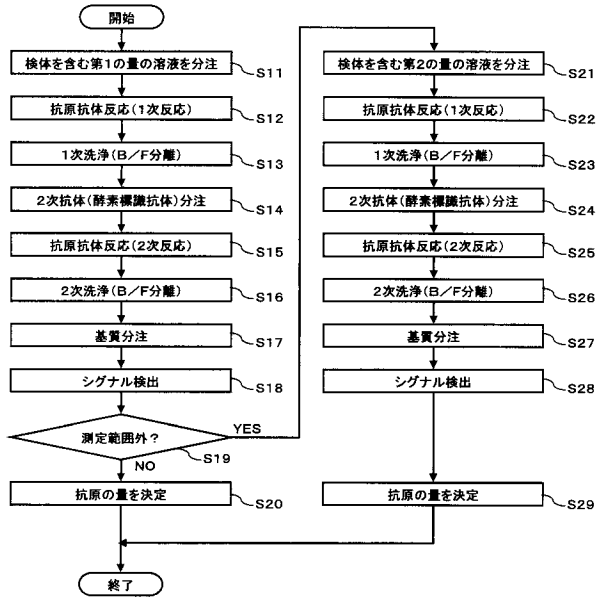
【 図 4 】



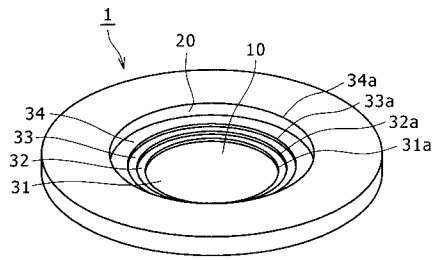
【 図 5 】



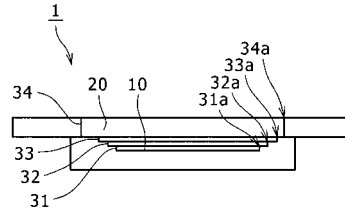
【 図 6 】



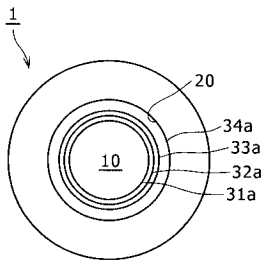
【 図 7 】



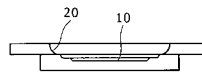
【 図 8 】



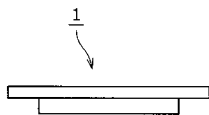
【 図 9 】



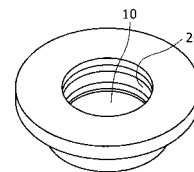
【 図 1 2 】



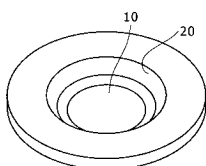
【 図 1 0 】



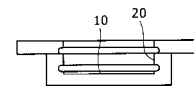
【 図 1 3 】



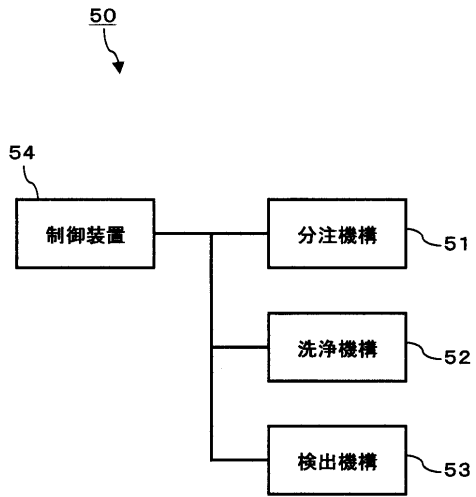
【 図 1 1 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



专利名称(译)	免疫测定方法和装置		
公开(公告)号	JP2011069755A	公开(公告)日	2011-04-07
申请号	JP2009221897	申请日	2009-09-28
[标]申请(专利权)人(译)	日立阿洛卡医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	阿洛卡有限公司		
[标]发明人	松葉恭一 齊藤博樹		
发明人	松葉 恭一 齊藤 博樹		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/543.501.L G01N33/53.N G01N33/543.521		
代理人(译)	吉田健治 石田 純		
其他公开文献	JP5396217B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：当在样品中待测量的抗原或抗体的含量超过免疫测定中的初始测量范围时，有利于在扩大测量范围的同时进行重新测量。甲免疫测定方法，在反应容器的抗体或抗原的预定量的固定化，其包含含有抗原或要测量抗体的样品的第一量的溶液被注入，和抗原 - 抗体复合物第一测量步骤 (S1)，通过测量抗原 - 抗体复合物的量来测量样品中包含的抗原或抗体的量，以及测量样品中包含的抗原或抗体的量的第二测量步骤 (S1)，当第一量中含有的抗原或抗体的量超过第一测量步骤的测量范围时，在固定有预定量的抗体或抗原的另一个反应容器中，第二测量步骤 (S2)，通过注入第二量的溶液以形成抗原 - 抗体复合物并测量抗原 - 抗体复合物的量来测量样品中包含的抗原或抗体的量) 一个。点域5

